



Methanothermobacter thermautotrophicusの電極付着特性解明によるメタン菌カソード微生物燃料電池の高効率化

著者	梅津 将喜
号	56
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農博第1231号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00127940

うめつ まさき

氏 名 () 梅津 将喜 ()

学 位 の 種 類 博士 (農学)

学 位 記 番 号 農博第 1231 号

学 位 授 与 年 月 日 令和 2 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項

研 究 科 , 専 攻 東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 資源生物科学専攻

論 文 題 目 *Methanothermobacter thermautotrophicus* の電極付着特性解明によるメ
タン菌カソード微生物燃料電池の高効率化

博士論文審査委員 (主査) 准教授 多田 千佳

教授 米山 裕

教授 北澤 春樹

助教 福田 康弘

論文内容要旨

Methanothermobacter thermautotrophicus の 電極付着特性解明による メタン菌カソード微生物燃料電池の高効率化

東北大学大学院農学研究科

資源生物科学専攻

梅津 将喜

指導教員

多田 千佳 准教授

第一章 緒論

微生物燃料電池 (MFC :Microbial Fuel Cell)は、微生物の代謝によって生じた電子を取り出し、有機物を直接電気に変換する技術である。MFC は複雑な有機物を基質として利用することができ、好気性処理と比べ発生する汚泥の量が非常に少ないことから¹⁾、排水処理への応用が期待されている。一方、従来の MFC では白金カソードによって酸素還元を行うことで発電を行なっている。そのため、カソードコストが高く、将来的な資源リスクがあることから、代替となるカソード触媒の開発が求められている。

そこで本研究では白金触媒の代わりに、メタン生成古細菌(以下、メタン菌と表記)をカソード触媒として利用したメタン菌カソード MFC を作成した。メタン菌は細胞外の導電物質を介して直接電子を受け取り、メタン生成を行うことが報告されている²⁾。この代謝経路を利用し、電極上のメタン菌に電圧を加え、メタン生成を促進するメタン生成 MEC (Microbial Electrolysis Cell)の研究が進んでいる^{3),4)}が、メタン生成反応の酸化還元電位の低さから、メタン菌カソード MFC による発電はできないと考えられてきた⁵⁾。一方で、一部の有機物分解菌とメタン菌において、導電性タンパク質で結びつき電子の直接的な授受を行なっていることが示唆されている。そこで、アノード電極に有機物分解菌、カソード電極にメタン菌を付着させ嫌気共生を再現することで発電が起きるのではないかと考えた。

本研究では、代表的な高温水素資化性メタン菌である *Methanothermobacter thermautotrophicus* ΔH をカソード触媒として利用した MFC を作成し発電とメタン生成を行うとともに、カソード上のメタン菌付着量に着目し、メタン菌カソード MFC の高効率化を行なった。

第二章 メタン菌カソード MFC による発電

本章では *M. thermautotrophicus* をカソード触媒に利用した MFC を用いて、外部電源や電子メディエータを用いずに発電とメタン生成を行うことができるのか確認した。

(1) バッチ式メタン菌カソード MFC による発電

[実験方法] 2つの 500 mL バイアル瓶をつなげた H 型の MFC を使用した。アノードおよびカソード電極には滅菌したカーボンフェルト(3.0×8.0×0.5 cm, CARBORON® felt; Nippon Carbon Co., Ltd., Japan)を用いた。アノードチャンバーにのみ有機物(プロピオン酸 10 mM)とメタン生成抑制剤(ブロモエタンスルホン酸(BES) 0.5 mM)を添加し、嫌気性汚泥 50 mL を接種後 N₂ ガスで曝気した。カソードには *M. thermautotrophicus* strain ΔH (NBRC 100330)をカソード触媒として接種し、気層を CO₂ で置換した。MFC は 56°C の環境下で、73,120 分間(=約 50 日間)のバッチ運転を行った。

[結果] バッチ式メタン菌カソード MFC の発生電流値を Figure.1 に示した。培地サンプルを採取した直後(図中の矢印で示した時点)には電流値が大きく増減しているが、73,120 分間の運転において安定した電流を発電することに成功した。この時、運転期間内に発生した累積電流値から、2.71 mmol の電子が電流としてアノードからカソードへ移動したことが分かった。

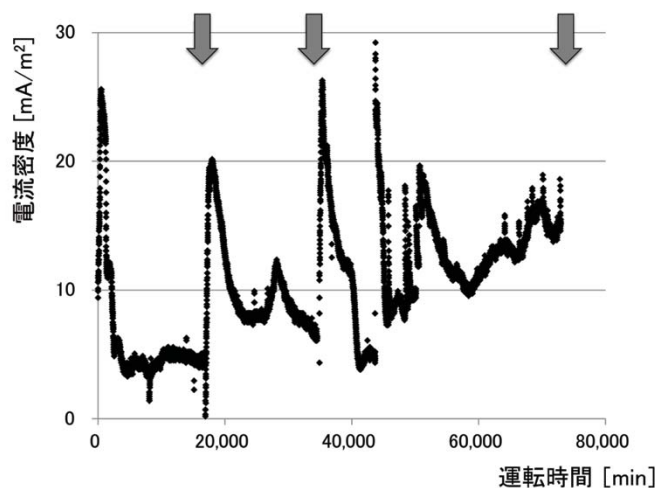


Figure.1 バッチ式メタン菌カソード MFC による発生電流値

カソード上のメタン菌が発電に関与しているのかを確認するために、カソード気層のガス分析を行ったところ、運転期間内に合計 0.23 mmol のメタンが生産されていた。化学反応式より、0.23 mmol のメタン生産には 1.84 mmol の電子が消費されることから、電流としてカソードに伝達された電子の 67.9 %がメタン菌によってメタンに変換されていたことが明らかになった。これらの結果から、メタン菌カソード MFC においてメタン菌がカソード触媒として機能し、発電とメタン生成を同時に行うことができることを世界で初めて確認した。

一方アノードチャンバーでは、嫌気性汚泥由来の微生物群集によって 87%の COD が除去され、96.63 mmol の電子が生産されていたが、電流に変換されていたのはこのうちのわずか 2.9%だった。さらに、アノード気層ではカソードの 16 倍以上のメタンが生産されており、電子の 30 %以上がアノード内のメタン菌によって消費されていた。

これより、メタン菌カソード MFC の発電性能を向上させるためには、両極間の物質伝達効率を高めると共に、アノード培地中でのメタン菌増殖を抑制する必要があると考えられた。そこで、電極間距離の小さいマイクロサイズ MFC を用いて連続運転を行うことにした。

(2) 連続運転式メタン菌カソード MFC による発電

[実験方法] 円柱形(直径 1 cm×厚さ 0.5 cm)のカーボンフェルトに、嫌気性汚泥由来の微生物群集および *M. thermautotrophicus* strain ΔH を事前に培養付着させることで、アノード電極およびカソード電極を作成した。これらの電極とマイクロセル(Microcell, Tsukuba Materials Information Laboratory, Ltd., Japan)を組み合わせて、マイクロサイズのメタン菌カソード MFC を作成した。滅菌した培地をそれぞれのチャンバーに 80 μL/min で送液し連続運転を行った。アノード培地にのみ有機物としてプロピオン酸 10 mM と酢酸ナトリウム 5 mM を添加した。

[結果] マイクロサイズのメタン菌カソード MFC による連続運転の結果を Figure.2 に示した。11,300 分間の運転の中で、最大 2,600 mA/m² と非常に高い電流密度を得ることができた。また、最も発生電流値の高かった 8,500 分時点の最大電力密度は 500 mW/m² だった。この値は、既報の白金カソード MFC を超える電力密度となっており、電池のマイクロサイズ化や連続運転により、メタン菌の代替触媒としての可能性を改めて示すことができた(Table 1)。

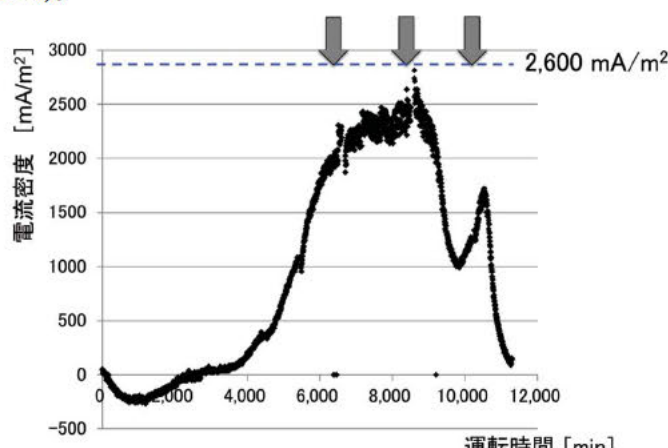


Figure.2 連続運転式メタン菌カソード MFC による発生電流値

Table.1 メタン菌カソード MFC と白金カソード MFC の性能比較

Cathode	COD removal (%)	Max power density (mW/m ²)	References
Carbon paper + Pt 0.35 mg/cm ²	75	494	[6]
Carbon cloth + Pt 0.50 mg/cm ²	93	2160	[7]
Carbon felt + <i>M. thermautotrophicus</i>	85	1.14	This study (Fed-Batch type)
”	31.4	500	This study (Continuous type)

連続運転式 MFC において発生電流値が 8,500 分以降に減少したことから、カソード上のメタン菌量を定量した結果、運転前には 2.76×10^9 copies/cm³ 付着していたメタン菌が、運転後には 9.42×10^6 copies/cm³ まで減少していた。メタン菌カソードでは、電極上に付着するメタン菌が触媒として機能すると考えられることから、メタン菌カソード MFC の性能を向上させるために、メタン菌と電極の親和性を改善し、より高密度なメタン菌カソードを作成する必要があると考えた。

第三章 *M. thermoautotrophicus* の付着特性の解明および付着性の向上

メタン菌の付着には、担体表面の多孔性や疎水性といった物理化学的性状が影響すると考えられているが、詳細な付着特性は未だ明らかになっていない。また既報の研究は中温の酢酸資化性メタン菌の付着性に集中し^{8,9)}、*M. thermautotrophicus* のような高温水素資化性メタン菌の付着性に関する知見は無かった。そこで本研究では、カーボンフェルト電極に 7 種類の化学的 surface 処理を行い、電極表面性状の変化とメタン菌の付着量の関係から、*M. thermoautotrophicus* の付着特性の解明と付着量の向上を行った。

(1) 電極表面の化学処理による *M. thermoautotrophicus* の付着特性の解明

[実験方法] カーボンフェルトに対し、蒸留水処理(コントロール区)に加え 7 種類の化学処理(KOH, NaOH, HCl, HNO₃, H₂SO₄, Na₂SO₄, Na₂HPO₄)を行った。カーボンフェルトの化学処理後、電極表面の疎水性(水接触角)と官能基分布の変化を計測した。

また第 2 章で行った事前培養と同様に、処理電極に対し *M. thermautotrophicus* を接種し、55 °C, 21 日間の培養の後メタン菌付着量の比較を行った。

[結果] 化学処理による電極表面の疎水性変化を評価するために、精製水に対する接触角を計測した。精製水処理を行ったカーボンフェルト(コントロール区)の接触角は、 $136 \pm 6.4^\circ$ と強い疎水性を示した。KOH, HCl, HNO₃, H₂SO₄ の処理区で有意な親水化が起きていた($p < 0.05$, t-test)が、最も接触角の小さい H₂SO₄ 処理担体($126 \pm 3.1^\circ$)においても、接触角が 90°以上であったことから、全ての処理電極が疎水性表面を持っていた。続いて FT-IR 分析をによって電極表面の官能基を測定したところ、化学処理によって -COOH, -C=O, -CH, -OH の 4 つの官能基量が変化していることが明らかになった。

定量 PCR を用いて、カーボンフェルト上の *M. thermautotrophicus* 付着量比較した。Figure 3 に示すように、コントロールと比較して NaOH, HCl, H₂SO₄, Na₂HPO₄ 処理を行ったカーボンフェルトで付着量が有意に増加した($p < 0.05$, t-test)。一方で、これら以外の処理電極ではコントロールとの間に有意な差は見られなかった。

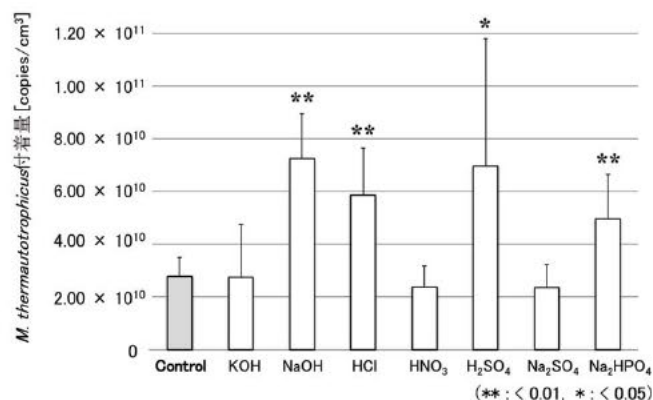


Figure.3 化学的表面処理を行った電極表面への *M. thermautotrophicus* 付着量の比較

メタン生成アーキアの細胞表面は、バクテリアと比べて疎水性の表面を持っていることから¹⁰⁾、疎水性を示す担体表面に付着しやすいと考えられている^{11,12)}。そこで、各処理電極の水接触角とメタン菌付着量の関係性を評価したが(Figure 4)、これらの間に相関関係は見られなかった($R^2=0.1688$)。

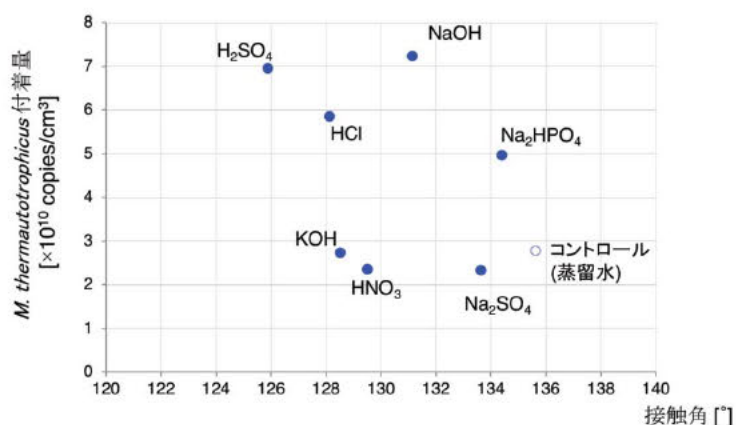


Figure.4 *M. thermautotrophicus* 付着量とカーボンフェルト表面の水接触角の関係

続いて、化学処理によって存在量に変化した4つの官能基とメタン菌の付着量について関係を調べたところ、メタン菌の付着量の多かった4処理(NaOH, H₂SO₄, HCl, NaH₂PO₄)では、-COOH基と-OH基がより強い相関関係($R^2=0.9607$)を示すことが分かった(Figure 5)。それに対し、メタン菌付着量が増加しなかったKOH, Na₂SO₄処理では、-COOH基と-OH基の相関は低かった。したがって、-COOH基と-OH基がバランス良く担体表面に修飾された時、メタン菌との親和性が向上する可能性がある。また近似曲線の傾きから、コントロールの官能基分布を基準に、-COOH:-OH=1:0.65の比で増加していることが望ましいと考えられた。

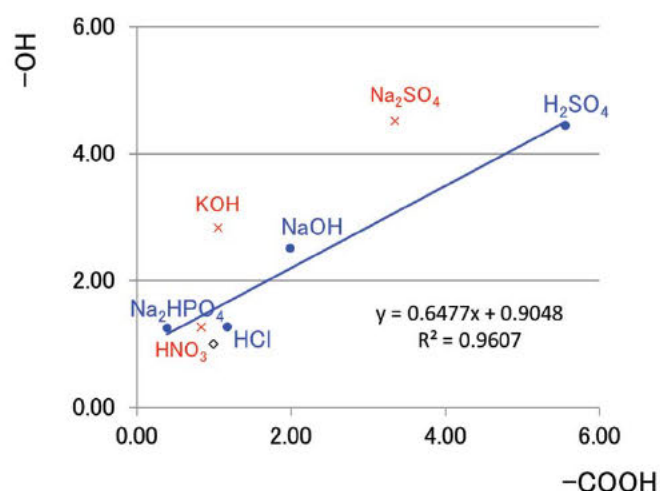


Figure. 5 *M. thermoautotrophicus* 付着量の増加した化学処理

(NaOH、HCl、H₂SO₄、Na₂HPO₄)における -OH 基および -COOH 基の相関関係

本研究の結果、カソード電極表面へのメタン菌の付着には、従来から考えられている疎水性に加えて、官能基の存在比も影響することが明らかとなった。また、カーボンフェルトに対し NaOH、H₂SO₄、HCl、Na₂HPO₄ の処理を行うことでメタン菌の付着量が向上し、高効率なメタン菌カソード電極の作成することが可能になった。

(2) *M. thermoautotrophicus* の化学処理による付着特性の解明

[実験方法] *M. thermoautotrophicus* の菌液を遠心分離(2,000g×10 min)後、上清を捨て NaOH、HCl で懸濁しすることで菌体の細胞表面を化学処理した。

[結果] Figure.3 の結果より、カーボンフェルト表面を NaOH や HCl で処理した時 *M. thermoautotrophicus* の付着量が有意に増加したが、本章において *M. thermoautotrophicus* の細胞表面を NaOH、HCl で懸濁したとき、*M. thermoautotrophicus* の付着量は減少した。これより、*M. thermoautotrophicus* と NaOH、HCl との間に親和性があるのではなく、化学処理によってカーボンフェルト表面の環境が変化することで、*M. thermoautotrophicus* の付着性が向上したことが示唆された。

第四章 高密度メタン菌カソードによる発電

第三章の結果より、NaOH 処理を行ったカーボンフェルト電極を作成し、高密度メタン菌カソード MFC による連続運転を行った。

[実験方法] 第三章と同様に、カーボンフェルト電極を精製水および 1.0 M NaOH でそれぞれ処理し、*M. thermoautotrophicus* を付着させた。さらに同一のマイクロサイズ MFC を 2 つ用意し、これらのメタン菌カソードを用いて連続運転をすることで高密度メタン菌カソードによる発電性能の効果を比較した。

この時の連続運転条件は、第二章と同様に、滅菌培地をそれぞれのチャンバーに 80 $\mu\text{L}/\text{min}$ で送液した。アノード培地にのみ有機物としてプロピオン酸 10 mM と酢酸ナ

トリウム 5 mM を添加し、56°C で運転を行った。

[結果] 精製水処理電極および NaOH 処理電極に付着した *M. thermautotrophicus* の量は、それぞれ 6.77×10^9 copies/mL, 1.50×10^{10} copies/mL であり、NaOH 処理によってメタン菌付着量が約 2 倍増加した。

これらの電極をカソードに用いて連続運転を行った結果、精製水処理区で 17 mA/m^2 , NaOH 処理区で 127 mA/m^2 と、約 7.5 倍高い電流値が得られた(Figure. 6)。これより、化学的表面処理によって作成した高密度メタン菌カソードによってメタン菌カソード MFC の発電性能を向上させることができることが示された。今後、よりカソードに適した電極材料やメタン菌種の探索を行い、さらなる高密度メタン菌カソードを開発することで、メタン菌カソード MFC の活用が期待できる。

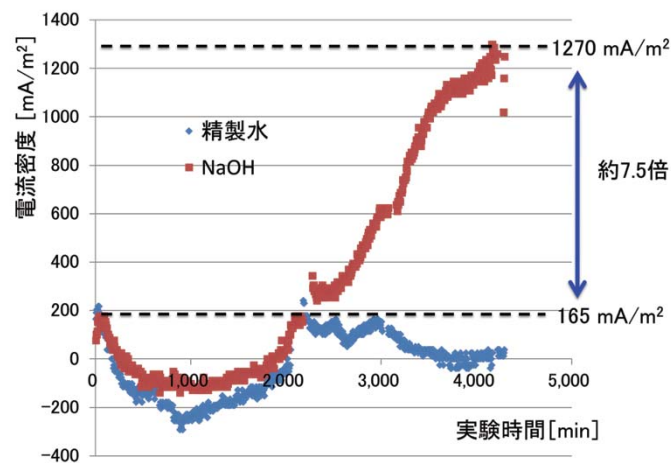


Figure. 6 NaOH 処理高密度メタン菌カソード MFC による発生電流値の比較

第五章 総括

本研究では、メタン菌をカソード触媒として利用した MFC において、発電とメタン生成を同時に行うことができることを世界で初めて確認した。また、メタン菌カソード MFC のマイクロサイズ化や連続運転により、既報の白金カソード MFC に匹敵する電力密度(500 mW/m^2)を達成し、カソード触媒としての可能性を改めて示すことができた。

カーボンフェルトへのメタン菌付着量が多い時、メタン生成速度の向上が見られたことから、カソード電極に *M. thermautotrophicus* を高密度に付着させることで、カソード性能を向上させることができると考えられた。そこで、カーボンフェルト表面の化学処理を行い、*M. thermautotrophicus* との親和性を向上させるとともに、付着特性の解明を行った。

本研究では、カーボンフェルト表面を NaOH、HCl、 H_2SO_4 、 Na_2HPO_4 によって表面処理した結果、*M. thermautotrophicus* の付着量が最大で 2.6 倍増加した。KOH, HCl, HNO_3 ,

H₂SO₄の処理区で、フェルト表面の有意な親水化が起きたが、表面疎水性とメタン菌付着量の間に相関関係は見られなかった。一方、*M. thermautotrophicus* 付着量の有意な増加が見られた化学処理区では、表面官能基が-COOH : -OH = 1 : 0.65 の比で分布していたことから、フェルト表面の官能基分布が *M. thermautotrophicus* の付着特性に影響していることが示唆された。

この結果より、実際に NaOH 処理を行ったメタン菌カソード MFC を用いて連続運転を行った。精製水で処理を行ったコントロール区と比べ、NaOH 処理をしたカーボンフェルト電極には2倍の *M. thermautotrophicus* が付着し、運転開始 4,000 分間でおおよそ 7.5 倍高い電流値を得ることに成功した。

これらの結果より、本研究ではカーボンフェルトの化学的表面処理により *M. thermautotrophicus* との親和性を向上させることで、メタン菌カソード電極の高効率化に成功した。

自立型のセンサー電源には、500 μ W 以上の電力出力が必要だと言われている¹³⁾。仮に、1 cm² 電極サイズの電池によって自立型センサーを動かそうとすると、500 μ W/cm² = 5,000 mW/m² の電力出力が必要となる。したがって、現在の最大電力密度(500 mW/m²) の 10 倍以上の発電性能を安定して供給することができれば、メタン菌カソード MFC によるセンサー電源への利用が現実的となる。

今後は、メタン菌カソード MFC の実現のために、より簡便なメタン菌カソード電極作成方法の開発や、カソード素材の選別を行っていく予定である。

参考文献

- [1] T. Huggins, P. H. Fallgren, S. Jin, Z. J. Ren, “Energy and Performance Comparison of Microbial Fuel Cell and Conventional Aeration Treating of Wastewater.” *Microbial & Biochemical Technology*, vol. 5, pp. 1–5, 2013.
- [2] S. Kato, “Biotechnological Aspects of Microbial Extracellular Electron Transfer.” *Microbes and Environments*, vol. 30, pp. 133–139, 2015.
- [3] S. Cheng, D. Xing, D. F. Call, B. E. Logan, “Direct biological conversion of electrical current into methane by electromethanogenesis.” *Environmental Science & Technology*, vol. 43, pp. 3953–3958, 2009.
- [4] Q. Fu, Y. Kuramochi, N. Fukushima, H. Maeda, K. Sato, H. Kobayashi, “Bioelectrochemical analyses of the development of a thermophilic biocathode catalyzing electromethanogenesis.” *Environmental Science & Technology*, vol. 49, pp. 1225–1232, 2015.
- [5] Z. He, L. T. Angenent, “Application of Bacterial Biocathodes in Microbial Fuel Cells.” *Electroanalysis*, Vol. 18, pp. 2009–2015, 2006.
- [6] B. Min, B. E. Logan, “Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat-plate microbial fuel cell.” *Environmental Science & Technology*, Vol. 38, pp. 5809–5814, 2004.
- [7] T. Catal, K. Li, H. Bermek, H. Liu, “Electricity production from twelve monosaccharides using microbial fuel cells,” *Journal of Power Sources*, vol. 175, pp. 196–200, 2008.
- [8] T. Nomura, “Control of microbial adhesion using fine particle technology,” *Advanced Powder Technology*, vol. 2, pp. 532–537, 2012.
- [9] V. Nguyen, E. Karunakaran, G. Collins, C. A. Biggs, “Physicochemical analysis of initial adhesion and biofilm formation of *Methanosarcina barkeri* on polymer support material.” *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 143, pp. 518–525, 2016.
- [10] D. Daffonchio, J. Thaveesri, W. Verstraete, “Contact angle measurement and cell hydrophobicity of granular sludge from upflow anaerobic sludge bed reactors,” *Applied Environmental Microbiology*, vol. 61, pp. 3676–3680, 1995.
- [11] Y. H. An, R. J. Friedman, “Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces,” *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 43, pp. 338–348, 1998.
- [12] A. Chauhan, A. Ogram, “Evaluation of support matrices for immobilization of anaerobic consortia for efficient carbon cycling in waste regeneration,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 327, pp. 884–893, 2005.
- [13] B. R. Ringeisen, E. Henderson, P. K. Wu, J. Pietron, R. Ray, B. Little, J. C. Biffinger, J. M. Jones-Meehan, “High Power Density from a Miniature Microbial Fuel Cell Using *Shewanella oneidensis* DSP10,” *Environmental Science & Technology*, vol. 40, pp. 2629–2634, 2006.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名	梅津 将喜
審 査 委 員	主査：准教授 多田 千佳 副査：教授 米山 裕 教授 北澤春樹 助教 福田康弘
学 位 論 文 題 目	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> の電極付着特性解明によるメタン菌カソード微生物燃料電池の高効率化
論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨	
<p>本論文は、近年注目されている燃料電池の中でも、有機性廃棄物などに含まれる有機物を微生物に分解させ、水素生産を行いながら発電する微生物燃料電池(MFC)に注目した研究である。従来法では、陰極にレア金属の白金を触媒として用い、水素を酸素で酸化する反応により電子を受け取る方法が主流であった。しかし、白金は資源枯渇が言われ、高価であり、さらに、採掘における環境負荷が問題であった。そこで、酸素ではなく、二酸化炭素をメタンに変換するメタン菌をカソード触媒に用いたメタン菌カソード電極による MFC について検討した。これまでも、バイオカソード電極は存在するが、反応に酸素が介在し、性能低下につながっていた。今回は、酸素を使わず、二酸化炭素を利用して電子を受け取るカソード電極は、世界初の試みである。メタン菌には、<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> の高温性メタン菌に注目した。その理由に、本菌がプロピオン酸酸化細菌と導電性の糸を介して共生関係を持つと知られるためである。実際に、バッチ式 MFC を用い、陽極にプロピオン酸と分解菌群を加え、陰極にはメタン菌と NaHCO_3 のみを供給して運転した結果、電流が流れた。その時、陰極からメタンガスが発生した。このガス発生量から計算すると、電流として流れた電子量の 67.9%がメタンガス変換に利用されたことがわかり、メタン菌がカソード触媒としての役割を果たすことが示された。さらに、連続式 MFC により、電力密度が $500\text{mW}/\text{m}^2$ に達した。この値は、既存の白金カソード電極による連続式 MFC に比べて高かった。これより、メタン菌が MFC において白金代替触媒として十分な性能を出せることを世界で初めて示した。しかし、電極表面にメタン菌の付着量が十分ではないことがわかった。よって、メタン菌を高密度に炭素電極に付着させ、性能を向上させることを目的に、メタン菌の炭素電極への付着特性について検討した。メタン菌の付着に関する研究は多いが、そこで明らかなのは、メタン菌の属種で細胞表面特性が異なり、担体への付着特性に一貫性がないことであった。また、今回、用いている <i>M. thermautotrophicus</i> の表面特性に関して知見がなく、さらに、既往研究では、材料も統一しておらず、様々な因子が含まれ、メタン菌と付着に関与する因子を特定できていなかった。そこで、本研究では、同一材料の炭素表面を7つの異なる化学処理を行い、<i>M. thermautotrophicus</i> の付着特性を確認した結果、通説であった親水性・疎水性ではなく、表面官能基のカルボキシル基と水酸基の比が 1:0.65 の時に、<i>M. thermautotrophicus</i> が化学処理の薬品種に寄らず、付着が向上することを明らかにした。これを踏まえ、NaOH 処理をした炭素を用いて、無処理に比較して初期付着量が2倍高いメタン菌カソード電極（高密度メタン菌カソード）を作製し、連続式 MFC で発電した結果、高密度メタン菌カソードでは、無処理に比較して 7.5 倍高い電流値を得られた。これより、メタン菌カソード電極の性能向上が高密度化によって可能であると示された。今後、アプライ先に有機性排水処理等の大規模施設に、白金より安価な本システムが導入可能になり、二酸化炭素を回収しながらエネルギーガスのメタン回収と発電を同時にできることが期待される。以上より、本研究には、世界初の学術的知見、今後課題となる白金枯渇などの材料の代替として新たな微生物材料の適用が可能であることを示した点、さらに、新たに <i>M. thermautotrophicus</i> の付着特性を解明し、それを利用して高性能なメタン菌カソード電極生産を可能にしたことなどから、博士（農学）の学位授与に値するものであると認定した。</p>	